Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 179- 194

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 18، شماره 2، خرداد- تیر 1401، ص. 194-179

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Particle size and root diameter effects on the extraction of glycyrrhizic acid from licorice using ultrasonic: Full factorial experimental design and response surface methodology

Zarrin Nasri[1*]

Received: 2020.11.02
Accepted: 2021.02.27

How to cite this article:
Nasri, Z. (2022). Particle size and root diameter effects on the extraction of glycyrrhizic acid from licorice using ultrasonic: Full factorial experimental design and response surface methodology. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 179-194.

Abstract

Introduction: Licorice is one of the most important medicinal plants in the world. This plant has been used in the world for more than 2000 years and is applied in various industries including pharmaceutical, food and tobacco industries. Iran is one of the best regions in the world in terms of medicinal plants. The roots of the licorice plant are widely used in the food and pharmaceutical industries. These roots are strong natural sweeteners, about 50-170 times sweeter than sucrose. The value of this plant is related to its chemical components. Glycyrrhizin is the most abundant component of this plant and is present in licorice in the form of potassium or calcium salt of glycyrrhizic acid and is considered as an indicator of licorice quality. In recent years, novel extraction methods with different energy sources have been proposed for improving extraction efficiency. Higher extraction efficiencies can be achieved by using microwave, ultrasonic and high pressure methods. In the ultrasonic extraction method, the extraction rate increases due to the presence of cavitation. The cavities formed in the solvent grow and then collapse rapidly, releasing a large amount of energy that increases the local temperature and pressure. Therefore, the solvent penetrates more into the plant cell material and the contents of the plant cells are released into the solvent medium. Also, physical effects such as liquid circulation and turbulence produced by cavitation help to increase the contact surface between the solvent and the plant particles and lead to more solvent penetration into the plant matrix.

Materials and Methods: The aim of this study is to statistically investigate the effect of particle size and licorice root diameter on the rate of glycyrrhizic acid extraction using ultrasonic. The full factorial experimental design method and response surface methodology have been used to determine the levels of the parameters and to model the responses, respectively. Independent variables included particle size of licorice root at three levels (35-60, 60-120, ≥ 120 mesh) and licorice root diameter is at three levels (1-2, 2-3, ≥3 cm). Total extract and glycyrrhizinic acid yield are considered as response variables. The solvent used was ammonia and the analysis of glycyrrhizic acid in the extract was performed by HPLC method. The licorice root used in this research was from Bojnourd region. Monoammonium glycyrrhizic acid (99.5%) was purchased as an HPLC standard from Sigma and ammonia from Merck. The method of glycyrrhizic acid extraction from licorice root was based on the British Pharmacopoeia method in this research.

Result and Discussion: The results showed that regarding the response glycyrrhizic acid yield, the parameter licorice root diameter had a significant effect on the response, but the particle size parameter had no significant effect. Also, two parameters had interaction. Based on the modeling results of the extraction process, the optimal conditions for obtaining the maximum total extract of licorice root included particle size, 125 µm (120 mesh) and licorice root diameter, 3.28 cm, which leaded to 68.16 wt% total extract. The optimal response conditions for glycyrrhizic acid yield from licorice root included particle size, (120 mesh) and licorice root diameter, 2.72 cm, which leaded to the extraction of 6.02 wt%glycyrrhizic acid from the root. Also, a comparison was performed between glycyrrhizic acid extraction from licorice in ultrasonic bath and ultrasonic probe. The results showed that the amount of glycyrrhizic acid extraction

1 Assistant professor of Chemical Engineering, Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), P.O. Box 33535111,Tehran, Iran.
(*Corresponding Author Email: zn_nasri@yahoo.com, nasri@irost.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.67074.0

was similar and was equal to 5.5 wt%. The effect of particle size distribution has also been investigated. According to the results in ultrasonic extraction, particle size distribution had a positive effect on extraction.

According to the results of this research, the parameter of licorice root diameter had a significant effect on the response of glycyrrhizic acid yield and with decreasing licorice root diameter, the amount of glycyrrhizic acid extraction increased. Also, the efficiency obtained by extraction method in ultrasonic bath is compared with ultrasonic probe. It can be concluded that glycyrrhizic acid extraction from licorice with using ultrasonic is an effective method for extraction.

Keywords: Licorice, Ultrasonic, Glycyrrhizic acid, Response Surface Methodology

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 179- 194

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 18، شماره 2، خرداد-تیر 1401 ص.194-179

مقاله علمی-پژوهشی

تاثیر اندازه ذره و قطر ریشه بر استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان با استفاده از التراسونیک: طراحی تجربی فاکتوریل و روش مدلسازی سطح پاسخ

زرین نصری

تاریخ دریافت: 1399/08/12
تاریخ پذیرش: 1399/12/09

چکیده

در این پژوهش تاثیر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان بر میزان استخراج اسید گلیسیریزیک با استفاده از التراسونیک بررسی شد. از روش طراحی تجربی فاکتوریل کامل و روش سطح پاسخ برای تعیین سطوح پاسخ پارامترها و مدل کردن پاسخ استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل اندازه ذره ریشه شیرین بیان در سه سطح (120 ≤، 120-60، 60- 35 مش) و قطر ریشه شیرین بیان در سه سطح (3 cm ≤ 3، 2– 2، 1- 2) بود. میزان عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک به‌عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند. نتایج نشان داد که قطر ریشه شیرین بیان تاثیر معنی‌داری بر بازدهی اسید گلیسیریزیک داشت، در حالی که تاثیر معنی‌داری بر اندازه ذره مشاهده نشد. بر اساس نتایج مدلسازی فرایند استخراج، شرایط بهینه حداکثرسازی میزان عصاره کلی از ریشه شیرین بیان شامل اندازه ذره، 125 µm≥ (120 mesh ≤) و قطر ریشه شیرین بیان، 3/28 سانتی‌متر حاصل شد که منجر به استخراج عصاره کلی از ریشه شیرین بیان به میزان 68/16 درصد وزنی گردید. شرایط بهینه بازدهی اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان شامل اندازه ذره، 125 µm≥ (120 mesh ≤) و قطر ریشه شیرین بیان، 2/72 سانتی‌متر بود که منجر به استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان به میزان 6/02 درصد وزنی گردید. همچنین مقایسه بین استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان در حمام التراسونیک و با پراب التراسونیک نشان داد که میزان استخراج اسید گلیسیریزیک توسط پراب التراسونیک و در حمام التراسونیک مشابه و برابر با 5/5 درصد وزنی بود. به‌طور کلی از نتایج این پژوهش می‌توان ادعا کرد که روش سطح پاسخ یک روش مطمئن برای بهینه‌سازی شرایط فرایندی استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان با استفاده از التراسونیک است.

واژه‌های کلیدی: شیرین بیان، التراسونیک، اسید گلیسیریزیک، روش سطح پاسخ

مقدمه

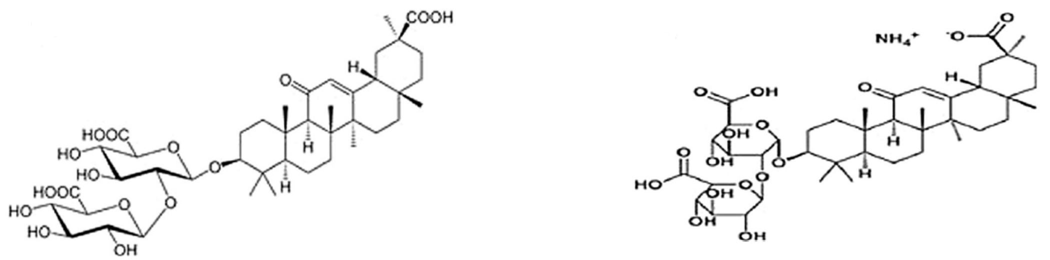
ایران یکی از بهترین منابع مهم گیاهان دارویی به‌لحاظ شرایط آب و هوایی در سطح جهانی است. شیرین بیان یکی از قدیمی‌ترین و محبوب‌ترین گیاهان دارویی در بسیاری از کشورهای آسیایی و اروپایی است. این گیاه برای بیش از 2000 سال در دنیا استفاده می‌شود (Ming, 2007). ریشه‌های گیاه شیرین بیان شیرین‌کننده طبیعی قوی، حدود 170-50 برابر شیرین‌تر از ساکارز هستند. اجزاء شیمیایی ریشه این گیاه شامل گلیسیریزین (16٪)، قندهای مختلف (18٪)، فلاونوئیدها، ساپونوئیدها[2]، استرول‌ها، نشاسته‌ها، آمینواسیدها، صمغ‌ها و اسانس است (Ahmadi Hosseini et al., 2014).

گلیسیریزین فراوانترین جزء این گیاه می‌باشد و به‌صورت نمک پتاسیم یا کلسیم اسید گلیسیریزیک در شیرین بیان موجود است و به‌عنوان شاخص کیفیت شیرین بیان محسوب می‌گردد (Ming, 2007). شکل 1 ساختارهای شیمیایی اسید گلیسیریزیک و گلیسیریزین را نشان می‌دهد (Noori et al., 2018).در سال‌های اخیر برای افزایش راندمان استخراج، از روش‌های استخراج نوینی مانند مایکروویو، التراسونیک و روش‌های فشار بالا استفاده می‌شود (Ming, 2007). در روش استخراج با التراسونیک نرخ استخراج به‌واسطه حضور کاویتاسیون افزایش می‌یابد. Pan و همکاران (2000) با استفاده از روش مایکروویو حداکثر بازدهی استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان را 3 درصد وزنی به‌دست آوردند. پارامترهای مورد بررسی شامل زمان استخراج، غلظت حلال، نسبت حلال به جامد و اندازه ذره بود. Mukhopadhyay و Panja (2008) استخراج اسید گلیسیریزیک را از ریشه شیرین بیان تحت فشار بررسی نمودند. حداکثر غلظت مونوآمونیوم گلیسیریزات در محلول استخراج از شیرین

1- استادیار، گروه فناوری‌های شیمیایی سبز، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران.
(* - نویسنده مسئول: Email: nasri@irost.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.67074.0
2 Saponoids

بیان در شرایط 110 درجه سانتی‌گراد، فشار 5 اتمسفر، نسبت محلول آمونیاک به گیاه 40 ml/g و زمان استخراج 90 دقیقه حاصل شد و برابر با 13/6 درصد وزنی با روش رنگ سنجی با UV بود.

Charpe و Rathod (2012) استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان را با روش التراسونیک بررسی کردند. حداکثر بازدهی اسید گلیسیریزیک برابر با 36/4 mg/g به‌دست آمد. شرایط بهینه شامل زمان استخراج 10 دقیقه، نسبت حلال به حل‌شونده 1:30، درجه حرارت 40 درجه سانتی‌گراد و فرکانس 25 کیلوهرتز بود. آنها روش استخراج با التراسونیک را با روش‌های متداول شامل استخراج در یک ظرف همزن‌دار و استخراج با سوکسله مقایسه کردند و نتیجه گرفتند که روش التراسونیک منجر به کاهش زمان و بازدهی بالاتر گردید.



(الف) (a) (ب) (b)

شکل 1- ساختارهای شیمیایی (الف) اسید گلیسیریزیک (ب) گلیسیریزین

Fig. 1. Chemical structures (a) glycyrrhizic acid (b) glycyrrhizin

Charpe و Rathod (2014) استخراج اسید گلیسیریزیک را از شیرین بیان با کمک التراسونیک بررسی کردند. شرایط بهینه شامل اتانول 50٪ به‌عنوان حلال، توان 230 وات، نسبت حلال به جامد 1:40، درجه حرارت 30^0C و فرکانس 40 کیلوهرتز بود که در این شرایط 95/69٪ استخراج در 20 دقیقه صورت گرفت. Hemati و همکاران (2015) تاثیر قطر ریشه را بر خواص آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، فلاونوئید کل و گلیسیریزین در ریشه شیرین بیان بررسی کردند. Shabkhiz و همکاران (2015) استخراج اسید گلیسیریزیک را از شیرین بیان تحت فشار بررسی کردند. بیشترین بازده استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان در فشار 15 بار و درجه حرارت 90 درجه سانتی‌گراد بود. آنها حداکثر استخراج اسید گلیسیریزیک را 51/570 میلی گرم بر گرم نمونه خشک به‌دست آوردند. Ahmadian و همکاران (2018) روش التراسونیک را در استخراج گلیسیریزین از شیرین بیان به دو صورت پیش التراسونیک (ابتدا التراسونیک و سپس حرارت) و پسا التراسونیک (ابتدا حرارت و سپس التراسونیک) استفاده کردند و نتایج را با یک روش اصلاح شده متداول (حرارت و جداسازی ناخالصی‌ها با حلال اتانول) مقایسه کردند. نتایج نشان داد که روش پساالتراسونیک و روش اصلاح شده متداول به‌ترتیب حداکثر و حداقل بازدهی استخراج را داشتند. Liao و همکاران (2016) پارامترهای توان، فرکانس، درجه حرارت و زمان را بر استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان با استفاده از التراسونیک بررسی کردند. بالاترین مقدار اسید گلیسیریزیک برابر با 217/7 mg/g در شرایط بهینه شامل 125 وات، 55 کیلوهرتز، 25 درجه سانتی‌گراد و 10 دقیقه به‌دست آمد. Khanahmadi و همکاران (2018) گزارش کردند که بالاترین راندمان استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان 54/9% در شرایط زمان استخراج 17 ساعت، نسبت حلال به جامد 10 ml/g، pH 10 و درجه حرارت 60 درجه سانتی‌گراد به روش بهینه‌سازی سطح پاسخ بود.

مطالعات نشان داد که روش‌های استخراج متداول برای استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان دارای معایبی مانند زمان استخراج بالا، بازدهی کمتر و درجه حرارت استخراج بالاتر است (Charpe and Rathd, 2012). در این پژوهش بررسی آماری و مدل‌کردن تاثیر متغیرهای وابسته شامل اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان بر میزان عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک در فرایند استخراج با روش التراسونیک ارزیابی شد. استخراج با التراسونیک در مقایسه با روش‌های متداول سریع‌تر است. این امر به‌واسطه شکست ذرات است که سطح تماس بین جامد و مایع را افزایش می‌دهد. مطالعات نشان داد که مدلسازی تاثیر قطر ریشه شیرین بیان و اندازه ذره در استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان با کمک التراسونیک تاکنون مطالعه نشده است. شرایط بهینه استخراج برای حداکثرسازی پارامترهای هدف با استفاده از مدل درجه دوم کاهش یافته توسط روش سطح پاسخ به‌دست آمد. مقایسه میان میزان استخراج اسید گلیسیریزیک

توسط حمام التراسونیک و پراب التراسونیک و همچنین تاثیر توزیع اندازه ذرات در میزان استخراج نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی شیرین بیان

ریشه شیرین بیان مورد استفاده در این پژوهش از منطقه بجنورد به صورت خشک تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفت. ریشه شیرین بیان دارای قطرهای مختلف شامل 3cm<، 3 -2، 2- 1 بود. ریشه-های شیرین بیان ابتدا آسیاب شده و سپس با استفاده از الک به پودرهای با اندازه‌های 120، 60 ، 35 مش سایزبندی شد. سپس در یک مکان سرد و تاریک تا زمان استفاده ذخیره گردید.

مواد شیمیایی و معرف‌ها

مونوآمونیوم گلیسیریزیک اسید با خلوص 99/5% به‌عنوان یک استاندارد HPLC از شرکت سیگما و آمونیاک از شرکت مرک خریداری شد.

فرایند استخراج

روش استخراج اسیدگلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان بر اساس روش British Pharmacopoeia (2009) در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. حلال مورد استفاده در مراجع جهت استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان آب، متانول، اتانول و آمونیاک است (Khanahmadi et al., 2018). در این پژوهش بر اساس روش British Pharmacopoeia (2009) از حلال آمونیاک استفاده شد. بر اساس این روش، به یک گرم ریشه شیرین بیان پودرشده با اندازه ذره مشخص، مقدار 100 میلی لیتر از محلول هیدروکسید آمونیوم (8 gr/lit) افزوده شد. سوسپانسیون حاصل سپس در حمام التراسونیک قرار داده شد. مدت زمان آزمایش در همه آزمایش‌ها ثابت و برابر با 30 دقیقه بود. استخراج با کمک التراسونیک در یک سیستم حمام التراسونیک با حجم 7 لیتر ساخت کشور ترکیه انجام گرفت. درجه حرارت به‌وسیله درجه حرارت آب در حمام التراسونیک کنترل گردید که می‌تواند سیرکوله شود و در درجه حرارت‌های مطلوب تنظیم گردد. در این پژوهش درجه حرارت مورد استفاده 70^0C بود. همچنین از سیستم پراب التراسونیک جهت مقایسه راندمان استخراج استفاده شد. دستگاه التراسونیک شامل پراب ساخت کشور آلمان با توان 250 وات بود. پس از آنکه استخراج صورت گرفت، سوسپانسیون حاصل فیلتر شد. سپس دو بار از عصاره مایع حاصل از استخراج نمونه‌برداری شده و در آون تا ثابت شدن وزن آن خشک شد و میزان عصاره خشک اندازه‌گیری شد. باقیمانده عصاره در شرایط سرد و خشک نگهداری شد تا آنالیز اسید گلیسیریزیک روی آنها انجام گیرد. مقادیر اسید گلیسیریزیک و جامدات کل نسبت به وزن خشک ریشه‌های شیرین بیان اندازه‌گیری شد.

جدول 1- مقادیر متغیرهای مستقل مورد استفاده برای طراحی تجربی استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان با روش التراسونیک

Table 1-The values of independent variables used for experimental design of glycyrrhizic acid extraction from licorice root by ultrasonic method

متغیرهای مستقل Independent variables	سطح Level		
	1	2	3
اندازه ذره (مش) Particle size (mesh)	120	60	35
متوسط قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) Average diameter of licorice root (cm)	1.5	2.5	3.5

روش آنالیز HPLC

آنالیز اسیدگلیسیریزیک با استفاده از دستگاه HPLC (Waters Company، امریکا) انجام شد. دستگاه شامل دو پمپ Waters 510 HPLC، آشکارکننده جذب قابل تنظیم Waters 486، آشکارکننده UV با طول موج 254 nm، ستون C18 و شیر تزریق Waters U6K بود. زمان اجرا برای جداسازی کروماتوگرافیک 45 دقیقه و زمان اقامت اسید گلیسیریزیک تقریبا 17/34 دقیقه بود. حجم تزریق برای همه آزمایش‌ها 10 میکرولیتر بود. پیک اسید گلیسیریزیک به‌وسیله مقایسه زمان اقامت با استانداردها شناسایی گردید. روش استانداردBritish Pharmacopoeia در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت (British Pharmacopoeia, 2009).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این مقاله به‌منظور بررسی تاثیر پارامترهای مستقل بر روی فرایند استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان با التراسونیک از روش سطح پاسخ استفاده شد. متغیرهای مستقل در این بررسی شامل اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان بود. متغیر وابسته وزن اسید گلیسیریزیک استخراج شده و میزان عصاره کلی به ازاء صد گرم ریشه شیرین بیان بود. از روش طراحی تجربی فاکتوریل کامل برای طراحی آزمایش‌ها استفاده شد. تعداد 9 آزمایش بر اساس روش طراحی فاکتوریل کامل انجام شد. بررسی آماری و بهینه‌سازی شرایط فرایندی با روش سطح پاسخ با استفاده از نرم‌افزار Design Expert (version 7) انجام شد. اثر معنی‌داری متغیرها در سطح 5٪ در نظر گرفته شد.

جدول 2- مقادیر متغیرهای مستقل مورد استفاده برای طراحی آزمایشات و نتایج تجربی متغیرهای وابسته

Table 2- The values of independent variables used to design experiments and experimental results of dependent variables

شماره Number	اندازه ذره (مش) Particle size (mesh)	قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) Diameter of licorice root (cm)	عصاره کلی (درصد وزنی) Total extract (wt%)	بازدهی اسید گلیسیریزیک (درصد وزنی) glycyrrhizic acid yield (wt%)
1	60	2.5	61.68	5.5
2	120	1.5	40.49	5.1
3	35	1.5	54.95	5.1
4	60	3.5	54.10	2.9
5	60	1.5	58.87	5.5
6	35	2.5	59.73	5.5
7	120	3.5	67.02	5.5
8	120	2.5	65.84	5.5
9	35	3.5	52.33	2.5

نتایج و بحث

بررسی آماری شرایط فرایندی با روش سطح پاسخ

جدول 2 مقادیر متغیرهای مستقل مورد استفاده برای طراحی آزمایشات و نتایج تجربی متغیرهای وابسته را نشان می دهد.

ارزیابی پاسخ عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک

جدول 3 و 4 نتایج آنالیز واریانس را برای مدل کاهش یافته درجه دوم با آثار متقابل به‌ترتیب در مورد پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که اندازه ذره (A) و قطر ریشه شیرین بیان (B) تاثیر معنی‌داری بر عصاره کلی نداشت. در حالی که قطر ریشه شیرین بیان (B) تاثیر معنی‌داری بر پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک داشت، همچنین اندازه ذره (A) تاثیر معنی‌داری بر پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک نداشت. اثر متقابل متغیرهای عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک تاثیر معنی‌داری داشت. از میان جملات درجه دوم B^2 (قطر ریشه شیرین بیان) تاثیر معنی‌داری بر مدل‌ها داشت. ضریب تبیین R^2 مدل‌های درجه دوم عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک به‌ترتیب برابر با 0/8803 و 0/9088 بود که بیانگر اعتبار بالای مدل‌ها بود.

جدول 5 ضرایب جملات مدل را برای دو پاسخ عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک در حالت واقعی و کددار نشان می‌دهد. چنانکه در جدول 5**جدول** مشاهده می‌گردد، ضریب جملات قطر ریشه شیرین بیان و اندازه ذره در مدل پاسخ عصاره کلی (در حالت کددار) به‌ترتیب برابر با 4/2859 و 0/8058 است که نشان می‌دهد تاثیر قطر ریشه شیرین بیان بیشتر از تاثیر اندازه ذره بر پاسخ عصاره کلی است. این نتیجه با نتایج آنالیز واریانس (جدول 3) منطبق است. مقدار P برای دو پارامتر قطر ریشه شیرین بیان و اندازه ذره به‌ترتیب برابر با 0/0581 و 0/6334 است که بیانگر تاثیر بیشتر قطر ریشه شیرین بیان است. همچنین مشاهده می‌شود که هر دو پارامتر تاثیر مثبتی بر پاسخ عصاره کلی دارند. به عبارت دیگر، مقدار پاسخ عصاره کلی با افزایش هر دو پارامتر قطر ریشه شیرین بیان و اندازه ذره ، افزایش می‌یابد.

در مورد پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک نیز مشاهده می‌گردد که ضریب جملات قطر ریشه شیرین بیان و اندازه ذره (در حالت کددار) به‌ترتیب برابر با 0/6892- و 0/5036 است که نشان می‌دهد تاثیر قطر ریشه شیرین بیان کمی بیشتر از تاثیر اندازه ذره بر روی پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک است. این نتیجه‌گیری منطبق بر نتایج آنالیز واریانس (جدول 4) است. مقادیر P برای دو پارامتر قطر ریشه

شیرین بیان و اندازه ذره به‌ترتیب برابر با 0/0314 و 0/0687 برای پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک است که بیانگر تاثیر بیشتر قطر ریشه شیرین بیان است. همچنین مشاهده می‌شود که تاثیر قطر ریشه شیرین بیان بر روی پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک منفی است. به عبارت دیگر با افزایش قطر ریشه شیرین بیان، مقدار پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک کاهش می‌یابد. ولی تاثیر اندازه ذره بر روی پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک مثبت است. به عبارت دیگر با افزایش اندازه ذره ، مقدار بازدهی اسید گلیسیریزیک افزایش می‌یابد.

جدول 3- نتایج آنالیز واریانس برای مدل کاهش یافته درجه دوم با آثار متقابل در مورد پاسخ عصاره کلی

Table 3– The analysis of variance for the reduced quadratic model with interactions on the total extract response

منبع تغییرات **Source**	مجموع مربعات **Sum of Squares**	درجه آزادی **df**	میانگین مربعات **Mean Square**	مقدار F **F-value**	مقدار P **P-value**
Model مدل	455.82	4	113.96	7.35	0.0395
اندازه ذره (مش) **A-Particle size (mesh)**	4.12	1	4.12	0.27	0.6334
قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) **B-diameter of licorice root (cm)**	107.34	1	107.34	6.93	0.0581
AB	269.24	1	269.24	17.38	0.0140
B^2	121.39	1	121.39	7.83	0.0489
Residual باقیمانده	61.98	4	15.49		
Sum of Squares مجموع مربعات کل	517.80	8			
Standard Deviation انحراف استاندارد	3.94				
C.V. % ضریب تغییرات	6.88				
مجموع مربع‌های خطای پیش‌بینی شده **PRESS**	545.61				
R^2	0.8803				
Mean میانگین	57.2235				
Adeq Precision دقت کافی	8.3628				

جدول 4- نتایج آنالیز واریانس برای مدل کاهش یافته درجه دوم با آثار متقابل در مورد پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

Table 4- The analysis of variance for reduced quadratic model with interactions on glycyrrhizic acid yield response

منبع تغییرات **Source**	مجموع مربعات **Sum of Squares**	درجه آزادی **df**	میانگین مربعات **Mean Square**	مقدار F **F-value**	مقدار P **P-value**
Model مدل	10.48	4	2.62	9.96	0.0234
A-Particle size (mesh) اندازه ذره (مش)	1.61	1	1.61	6.11	0.0687
قطر ریشه شیرین بیان (سانتی متر) **B-diameter of licorice root (cm)**	2.78	1	2.78	10.56	0.0314
AB	2.75	1	2.75	10.48	0.0318
B^2	2.28	1	2.28	8.66	0.0423
Residual باقیمانده	1.05	4	0.26		
Sum of Squares مجموع مربعات کل	11.53	8			
Standard Deviation انحراف استاندارد	0.51				
C.V. % ضریب تغییرات	10.71				
مجموع مربع‌های خطای پیش‌بینی شده **PRESS**	11.35				
R^2	0.9088				
Mean میانگین	4.7889				
Adeq Precision دقت کافی	9.3426				

در التراسونیک فروپاشی حباب‌ها شکست دیواره‌های سلولی را تسهیل نموده و نفوذ حلال به مواد خام بهتر صورت می‌گیرد. بنابراین سطح تماس ذرات جامد افزایش یافته و انتقال جرم از میان غشاء سلولی افزایش می‌یابد. روش‌های متداول استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان دارای معایبی مانند زمان استخراج زیاد، درجه حرارت استخراج بالاتر و بازدهی کمتر است (Liao et al., 2016). Charpe و Rathod (2012) استخراج اسید گلیسیریزیک را از ریشه شیرین بیان با روش التراسونیک و روش‌های متداول مقایسه کردند. نتایج نشان داد که در روش التراسونیک 37/3 mg/g اسیدگلیسیریزیک در 10 دقیقه، با سیستم استخراج‌کننده همزن‌دار 28/77 mg/g اسید گلیسیریزیک در 10 دقیقه و در روش سوکسله 37/63 mg/g اسیدگلیسیریزیک در 5 ساعت به‌دست آمد. Charpe و Rathod (2014) نیز گزارش کردند که با روش التراسونیک در 20 دقیقه 95/69 درصد و با روش متداول در 60 دقیقه، 68 درصد اسید گلیسیریزیک موجود در شیرین بیان استخراج شد. نتایج Ahmadian و همکاران (2018) نشان داد که در روش التراسونیک غلظت گلیسیریزین در محلول حاصل 10/485 و در روش متداول 0/6682 میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود.

جدول 5- مقادیر ضرایب جملات مدل برای دو پاسخ عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک در حالت واقعی و کددار

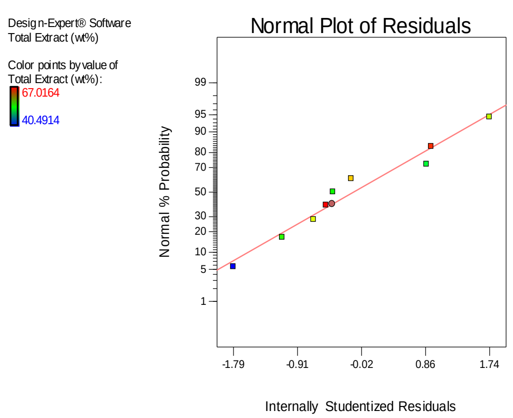
Table 5– The models coefficients for total extract and glycyrrhizic acid yield responses in real and coded state

	عصاره کلی (درصد وزنی) Total extract (wt%)		بازدهی اسید گلیسیریزیک (درصد وزنی) (wt%) glycyrrhizic acid yield	
	کددارCoded	واقعیReal	کددارCoded	واقعیReal
	62.5279	38.0392	5.5691	3.3876
Particle size (mesh) (مش) اندازه ذره *	0.8058	-0.4506	0.5036	-0.0356
* قطر ریشه شیرین بیان (سانتی متر) Diameter of licorice root (cm)	4.2859	28.6847	-0.6892	3.1720
* اندازه ذره (مش)* قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) Particle size (mesh) *Diameter of licorice root (cm)	7.9819	0.1878	0.8073	0.0190
قطر ریشه شیرین بیان^2 diameter of licorice root^2 (cm^2)	-7.7908	-7.7908	-1.0667	-1.0667

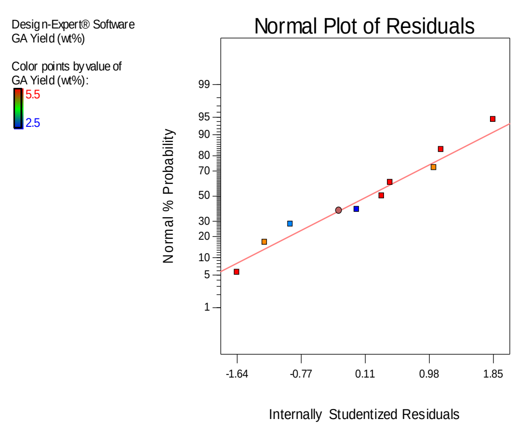
نمودارهای ارزیابی مدل

شکل 2 نمودار نرمال باقیمانده‌ها را برای پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهد. چنانکه مشاهده می‌شود نقاط بر روی خط راست قرار دارند و از توزیع نرمال تبعیت می‌کنند.

شکل3 نمودار باقیمانده‌ها برحسب مقادیر پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد. چنانکه مشاهده می‌شود نقاط در بین دو خط قرار دارند و بنابراین مدل به‌خوبی داده‌های تجربی را برازش می‌کند.



(a) (الف)

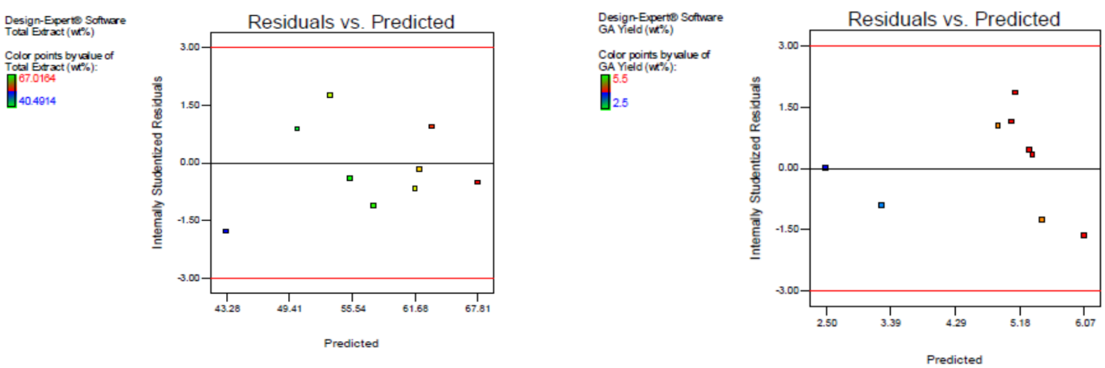


(b) (ب)

شکل 2- نمودار نرمال باقیمانده‌ها (الف) پاسخ عصاره کلی (ب) پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

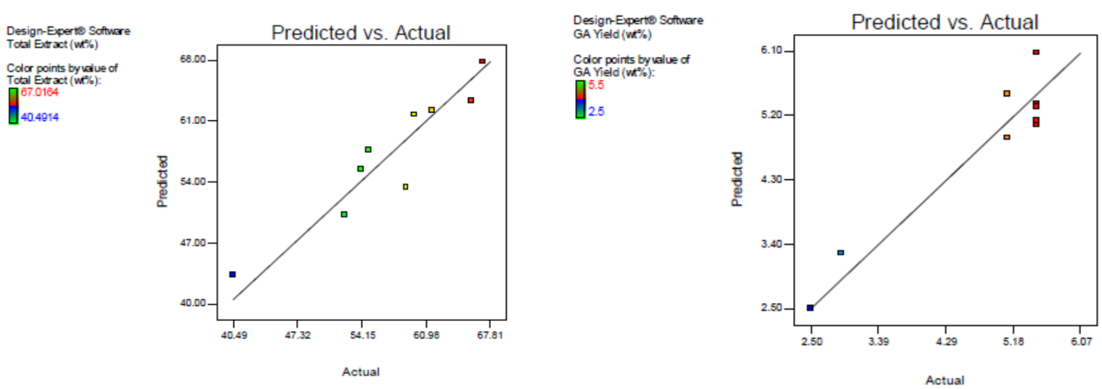
Fig. 2. Normal plot of residuals (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response

شکل 4 مقادیر داده‌های تجربی را بر حسب مقادیر پیش‌بینی شده به‌وسیله مدل نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که نقاط بر روی یک خط قرار دارند، بیانگر آن است که مدل به‌خوبی داده‌های تجربی را برازش می‌کند. شکل 5 نمودار Box-Cox را برای تبدیل توانی در مورد پاسخ عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهد. این نمودار مناسب‌ترین تبدیل توانی را برای داده‌های پاسخ تعیین می‌کند. 95٪ فاصله اطمینان حول بهترین مقدار lambda (نقطه مینیمم منحنی) شامل عدد یک است، بنابراین مدل‌ها مناسب است و هیچ تبدیل ویژه‌ای برای مدل پاسخ عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک پیشنهاد نمی‌شود.



(a) (الف) (b) (ب)

شکل 3- نمودار باقیمانده‌ها بر حسب مقادیر پیش‌بینی شده (الف) پاسخ عصاره کلی (ب) پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک
Fig. 3. The residuals against the predicted (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response



(a) (الف) (b) (ب)

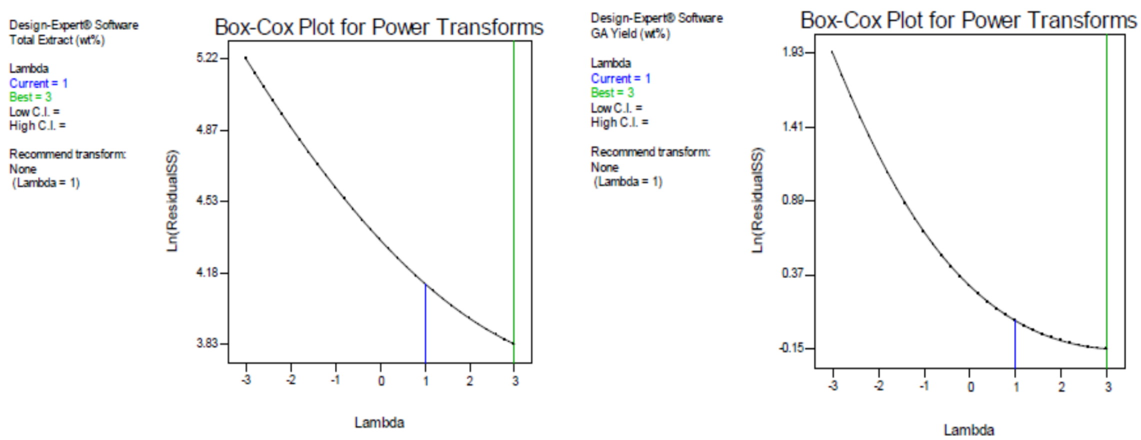
شکل 4- مقادیر داده‌های تجربی بر حسب مقادیر پیش‌بینی شده به وسیله مدل (الف) پاسخ عصاره کلی (ب) پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک
Fig. 4. The predicted against the actual values (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response

نمودارهای یک فاکتوری

شکل 7 تغییرات عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک را بر حسب قطر ریشه شیرین بیان نشان می‌دهد. اندازه ذره در مقدار ثابت (60mesh) در نظر گرفته شده است. چنانکه مشاهده می‌شود افزایش قطر ریشه شیرین بیان تاثیر معنی‌داری بر پاسخ عصاره کلی نداشت. همچنین مشاهده می‌شود که افزایش قطر ریشه شیرین بیان تاثیر معنی‌داری بر پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک داشت. این نتیجه‌گیری از نتایج آنالیز واریانس (جدول 4) نیز مشاهده می‌گردد. مقدار P برای این پارامتر برابر با 0/0314 است که بیانگر معنی‌دار بودن تاثیر این پارامتر است. نتایج نشان می‌دهدکه با افزایش قطر ریشه شیرین بیان، مقدار بازدهی اسید گلیسیریزیک کاهش یافته است که منطبق با ضرایب جملات مدل است. چنانکه در جدول 5 مشاهده می‌گردد ضریب جمله قطر ریشه شیرین بیان در حالت کددار برای بازدهی اسید گلیسیریزیک برابر با 0/6892- است.

مطالعات نشان داد که ریشه‌های دارای قطر کمتر به این علت مقدار اسید گلیسیریزیک بیشتری دارند که سطح جانبی آنها به ازاء هر واحد وزن خشک بیشتر است. بنابراین در مقایسه با ریشه‌های ضخیم‌تر جذب عناصر غذایی از خاک بهتر صورت می‌گیرد (Bolouri

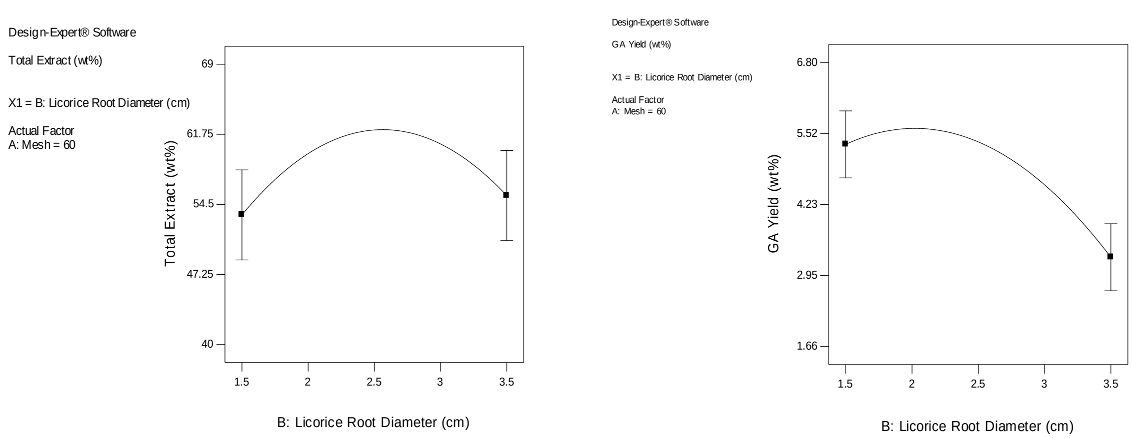
(Moghaddam et al., 2009). همچنین باید توجه داشت که اسید گلیسیریزیک در بافت‌های ریشه در درون پارانشیم پوستی تولید می‌شود. پارانشیم‌ها از بافت‌های مهم گیاهان به ویژه در گیاهان جوان محسوب می‌گردند. در ریشه‌های با قطر بیشتر در اثر فعالیت لایه زاینده، پوست از بین رفته و یک بافت چوب پنبه‌ای جایگزین آن می‌گردد که فاقد مواد موثره است (Bolouri Moghaddam et al., 2009). Douglas و همکاران (2004) نیز گزارش کردند که ریشه‌های با قطر کوچکتر، سطح تماس بزرگتری برای جذب مواد مغذی دارند که می‌تواند منجر به تجمع اجزاء فعال در آنها گردد. آنها نتیجه گرفتند که مقدار اسید گلیسیریزیک در ریشه‌های شیرین بیان با قطر کوچکتر بیشتر است. Bolouri Moghaddam و همکاران (2009) تاثیر استخراج گلیسیریزین با متانول را در سه قطر مختلف (1cm>، 1- 2، 2<) ریشه شیرین بیان بررسی کرده و نشان دادند که کمترین قطر ریشه‌ها، بیشترین میزان گلیسیریزین را داشت (1/187 درصد). تاثیر قطر ریشه و شرایط اکولوژی بر مقدار اسید گلیسیریزیک در دو نوع ریشه شیرین بیان نشان داد که مقدار اسید گلیسیریزیک با قطر ریشه شیرین بیان تغییر می‌کند. مقادیر متوسط اسید گلیسیریزیک در محدوده 3/40- 1/36 درصد بود (Ahmadi Hosseini et al., 2014). Usai و همکاران (1995) نیز در یک پژوهش، استخراج گلیسیریزین از شیرین بیان را در ریشه‌های با قطر 0/2 ، 0/6- 0/55 ، 1/7 سانتی‌متر به‌ترتیب 0/93، 1/30 و 2/24 درصد به‌دست آوردند.



(a)(الف) **(b) (ب)**

شکل 5– نمودار Box-Cox برای تبدیل توانی (الف) پاسخ عصاره کلی (ب) پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

Fig. 5. Box-Cox plot for power transforms (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response



(a) (الف) **(b) (ب)**

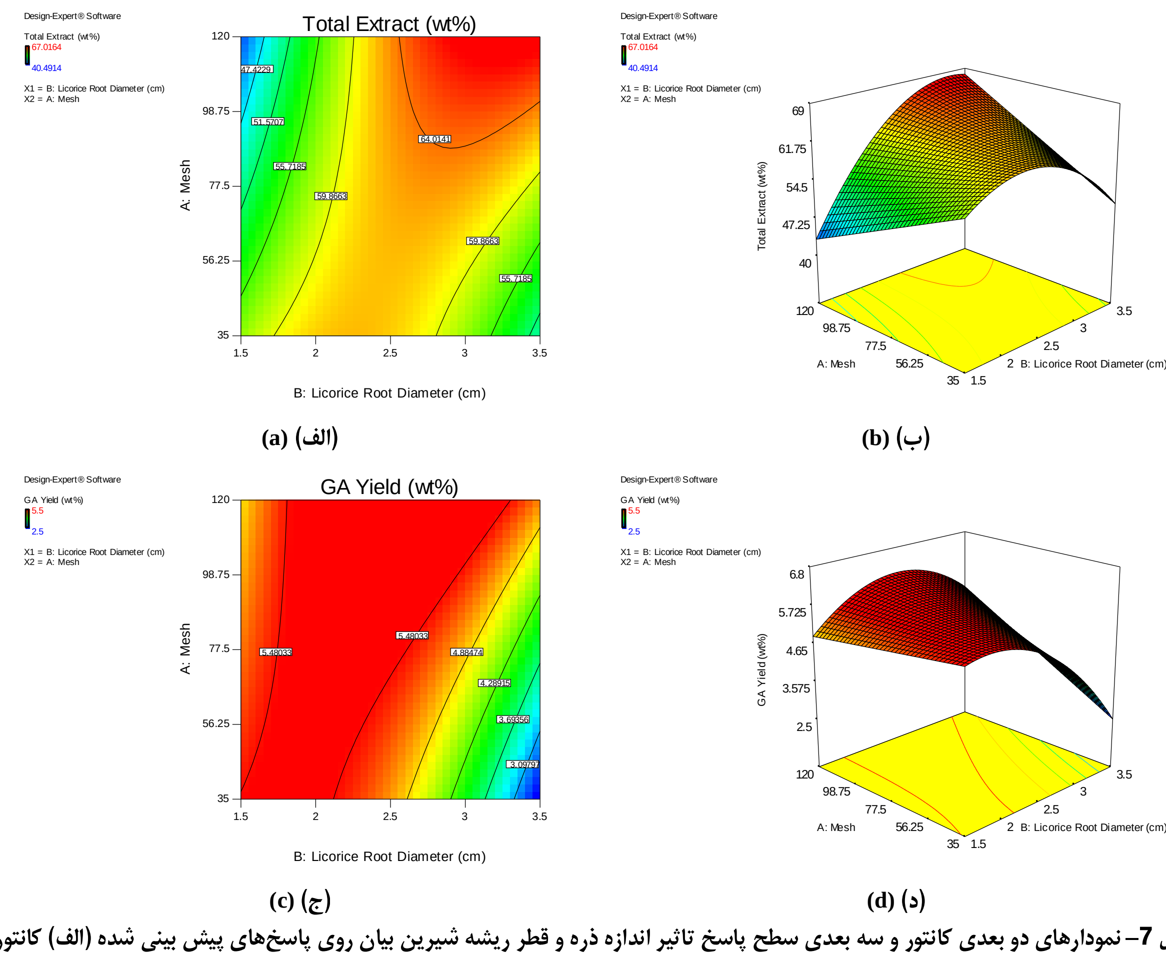
شکل 6– اثر پارامتر قطر ریشه شیرین بیان بر روی پاسخ‌ها (الف) عصاره کلی (ب) بازدهی اسید گلیسیریزیک

Fig. 6. The effect of licorice root diameter (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response

نمودار دو فاکتوری کانتور و سطح پاسخ

شکل 6 نمودارهای دو بعدی کانتور و سه‌بعدی سطح پاسخ تاثیر همزمان دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان را روی پاسخ-های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهد. چنانکه در شکل 7 (الف و ب) مشاهده می‌شود در مورد پاسخ عصاره کلی، دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان دارای اثر متقابل هستند. به عبارت دیگر، در مقادیر قطرهای کم ریشه شیرین بیان (1/5 cm)، با کاهش اندازه ذره (افزایش مش)، میزان پاسخ عصاره کلی کاهش می‌یابد. ولی در مقادیر زیاد قطر ریشه شیرین بیان (3/5 cm)، با کاهش اندازه ذره (افزایش مش)، میزان پاسخ عصاره کلی افزایش می‌یابد. بیشترین میزان استخراج عصاره کلی مربوط به حداکثر قطر ریشه شیرین بیان (3/5 cm) و حداقل اندازه ذره (120 mesh) است و برابر با 67/0164 درصد وزنی می‌باشد.

در مورد پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک نیز در شکل 7 (ج و د) مشاهده می‌شود که دو پارامتر دارای اثر متقابل هستند. به عبارت دیگر در مقادیر کم قطر ریشه شیرین‌بیان (1/5 cm)، با کاهش اندازه ذره (افزایش مش) تاثیر معنی‌داری بر پاسخ بازدهی اسیدگلیسیریزیک مشاهده نمی‌گردد. ولی در مقادیر زیاد قطر ریشه شیرین‌بیان (3/5 cm)، با کاهش اندازه ذره (افزایش مش)، میزان پاسخ بازدهی اسیدگلیسیریزیک افزایش معنی‌داری می‌یابد. بیشترین میزان استخراج اسید گلیسیریزیک مربوط به مقادیر کم قطر ریشه شیرین‌بیان و برابر با 5/5 درصد وزنی است.



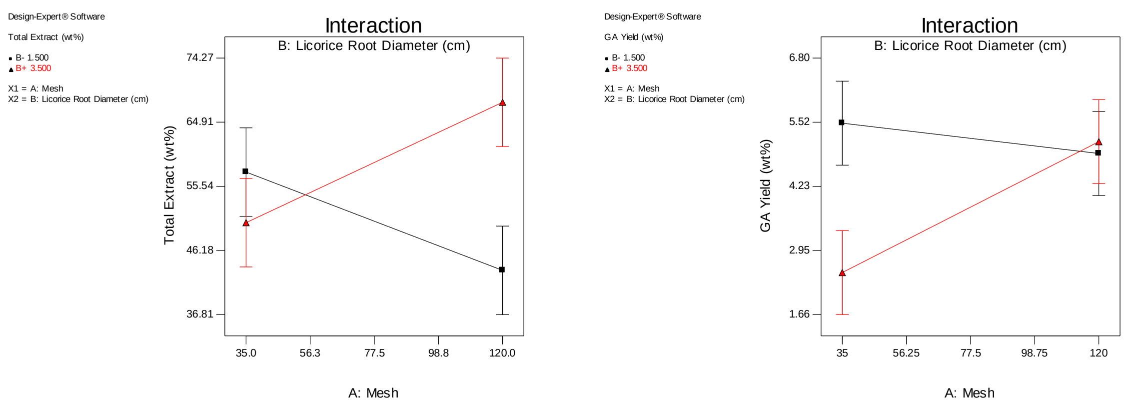
شکل 7– نمودارهای دو بعدی کانتور و سه بعدی سطح پاسخ تاثیر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان روی پاسخ‌های پیش بینی شده (الف) کانتور پاسخ عصاره کلی (ب) سطح پاسخ عصاره کلی (ج) کانتور پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک (د) سطح پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

Fig. 7. 2D contours and 3D response surface effects of particle size and diameter of licorice root on the predicted responses (a) Contours of total extract response (b) Response surface of total extract response (c) Contours of Glycyrrhizic acid yield response (d) Response surface of Glycyrrhizic acid yield response

باید توجه داشت که اندازه ذره روی سرعت استخراج موثر است. ذرات کوچکتر دارای مساحت سطح ویژه بزرگتر و مسیر نفوذ درون ذره کمتری هستند که منجر به تسهیل انتقال جرم می‌گردد. اما محدودیت‌های زیر مزایای استفاده از ذرات ریز را برای استخراج محدود می‌کند (Ming, 2007). 1)آسیاب کردن زیاد گیاه که منجر به ذرات ریز کوچکتر از 100 میکرومتر می‌شود می‌تواند سلول‌های گیاه را پاره کرده و باعث آزادسازی مقدار زیادی اجسام سلولی نامطلوب به داخل حلال گردد. این قسمت‌های نامطلوب شامل ترکیبات قابل حل در چربی، نشاسته و مواد کلوئیدی هستند. در نتیجه، وقتی قسمت‌های دارای مقادیر زیاد نشاسته مانند ریشه‌ها، خیلی آسیاب شده و استخراج در درجه حرارت بالا انجام گیرد، بازیابی قسمت‌های فعال و موثر گیاه به میزان زیادی کاهش می‌یابد. زیرا نشاسته‌های حل شده مانع انتقال جرم در سطح ذرات می‌گردد. 2)ذرات ریز تمایل به تشکیل بستر جامد فشرده دارند که حلال در آنها به سختی نفوذ می‌کند. بنابراین به کاربردن اندازه ذره مناسب اهمیت دارد.

نمودارهای اثر متقابل

شکل 8 تاثیر متقابل دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان را بر پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسیدگلیسیریزیک نشان می‌دهد. چنانکه در شکل 8 (الف) مشاهده می‌شود در مورد پاسخ عصاره کلی دو پارامتر دارای اثر متقابل هستند. در میزان اندازه ذره برابر با 120 mesh با افزایش قطر ریشه شیرین بیان میزان عصاره کلی افزایش می‌یابد. این نتیجه گیری منطبق بر نتایج آنالیز واریانس (جدول 3) است. مقدار P در مورد تاثیر متقابل دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان برای پاسخ عصاره کلی (جمله AB) برابر با 0/0140 است که بیانگر معنی‌دار بودن تاثیر این پارامتر است.



(الف) (a) **(ب) (b)**

شکل 8- تاثیر متقابل اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان بر پاسخ‌های (الف) عصاره کلی و (ب) بازدهی اسیدگلیسیریزیک

Fig. 8. Interaction between particle size and licorice root diameter on the responses (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response

در شکل 8 (ب) مشاهده می‌گردد که در مورد پاسخ بازدهی اسیدگلیسیریزیک نیز دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان دارای اثر متقابل هستند. در مقدار اندازه ذره برابر با 35 mesh، افزایش قطر ریشه شیرین بیان منجر به کاهش قابل‌ملاحظه‌ای بر پاسخ بازدهی اسیدگلیسیریزیک می‌گردد، ولی در مقدار اندازه ذره برابر با 120 mesh تغییرات قطر ریشه شیرین بیان تاثیر معنی‌داری بر پاسخ بازدهی اسیدگلیسیریزیک ندارد. این نتیجه گیری منطبق بر نتایج آنالیز واریانس (جدول 4) است. مقدار P در مورد تاثیر متقابل دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان برای پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک (جمله AB) برابر با 0/0318 است که بیانگر معنی‌دار بودن تاثیر این پارامتر است.

به‌طور کلی اندازه ذره یک نقش بحرانی در بسیاری از فرایندهای استخراج از گیاهان دارویی بازی می‌کند. با کاهش اندازه ذرات، سطح تماس افزایش می‌یابد و پدیده انتشار امواج التراسونیک به‌طور موثرتری رخ می‌دهد. در نتیجه بازده استخراج افزایش می‌یابد. اما وقتی اندازه ذرات نمونه بیش از حد کوچک شود به کاربردن امواج التراسونیک منجر به از هم گسیختگی شدید سلولی می‌گردد. بنابراین پدیده انتشار به‌خوبی صورت نمی‌پذیرد و در نتیجه افزایش قابل توجهی در بازده استخراج به‌دست نمی‌آید (Keyhani et al., 2016). علاوه بر این، ذرات خیلی کوچک در حلال استخراج شناور می‌شوند و تماس ذرات با حلال محدود می‌گردد (Yeop et al., 2017).

بهینه‌سازی

شرایط بهینه به منظور حداکثرسازی پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسیدگلیسیریزیک تعیین گردید. جدول 6 محدوده متغیرهای مستقل و وابسته را برای بهینه‌سازی پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهد. جدول 7 و 8 شرایط بهینه پیش‌بینی شده را برای پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهند. ستون مطلوبیت[1] در جدول 7 و 8 بیان‌کننده میزان قابل قبول بودن شرایط جهت بهینه‌سازی است. هر چه مقدار مطلوبیت به یک نزدیکتر باشد، پاسخ‌ها به معیار مشخص‌شده برای بهینه‌سازی نزدیک‌تر هستند. بر اساس نتایج جدول 7 شرایط بهینه برای حداکثر-سازی پاسخ عصاره کلی شامل اندازه ذره برابر با 120 mesh و قطر ریشه شیرین بیان برابر با 3/29 سانتی‌متر است. در این شرایط، پاسخ عصاره کلی برابر با 68/16 درصد وزنی است. بر اساس نتایج جدول 8 شرایط بهینه برای حداکثرسازی پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک شامل اندازه ذره برابر با 118/36 mesh و قطر ریشه شیرین بیان برابر با 2/72 سانتی‌متر است. در این شرایط، پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک برابر با 6/02 درصد وزنی است.

1 Desirability

جدول 6- محدوده متغیرهای مستقل و وابسته برای بهینه‌سازی پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک

Table 6- The range of independent and dependent variables for optimizing total extract and glycyrrhizic acid yield responses

متغیرVarible	هدفGoal	حد پایینLower Limit	حد بالاUpper Limit
اندازه ذره (مش) Particle size (mesh)	در محدوده in the range	35	120
قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) diameter of licorice root (cm)	در محدوده in the range	1.5	3.5
عصاره کلی (درصد وزنی) Total extract (wt%)	حداکثر سازی maximize	40	69
بازدهی اسید گلیسیریزیک (درصد وزنی) glycyrrhizic acid yield (wt%)	حداکثر سازی maximize	2.5	6

جدول 7- شرایط بهینه پیش بینی شده برای پاسخ عصاره کلی

Table 7– The predicted optimal conditions for total extract response

شماره Number	اندازه ذره (مش) Particle size (mesh)	قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) diameter of licorice root (cm)	عصاره کلی (درصد وزنی) Total extract (wt%)	مطلوبیت Desirability
1	120	3.29	68.16	0.97
2	120	3.31	68.16	0.97
3	120	3.17	68.05	0.97
4	35	2.26	62.16	0.76

جدول 8- شرایط بهینه پیش‌بینی شده برای پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

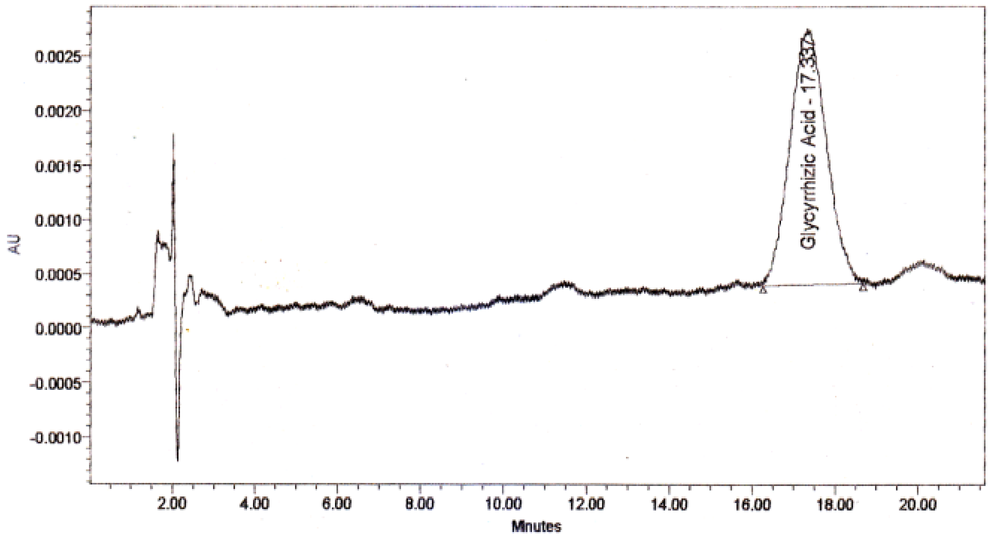
Table 8– The predicted optimal conditions for glycyrrhizic acid yield response

شماره Number	اندازه ذره (مش) Particle size (mesh)	قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) diameter of licorice root (cm)	بازدهی اسید گلیسیریزیک (درصد وزنی) glycyrrhizic acid yield (wt%)	مطلوبیت Desirability
1	118.36	2.72	6.02	1
2	116.90	2.56	6.04	1
3	119.88	2.62	6.07	1
4	115.58	2.48	6.02	1
5	116.33	2.46	6.03	1

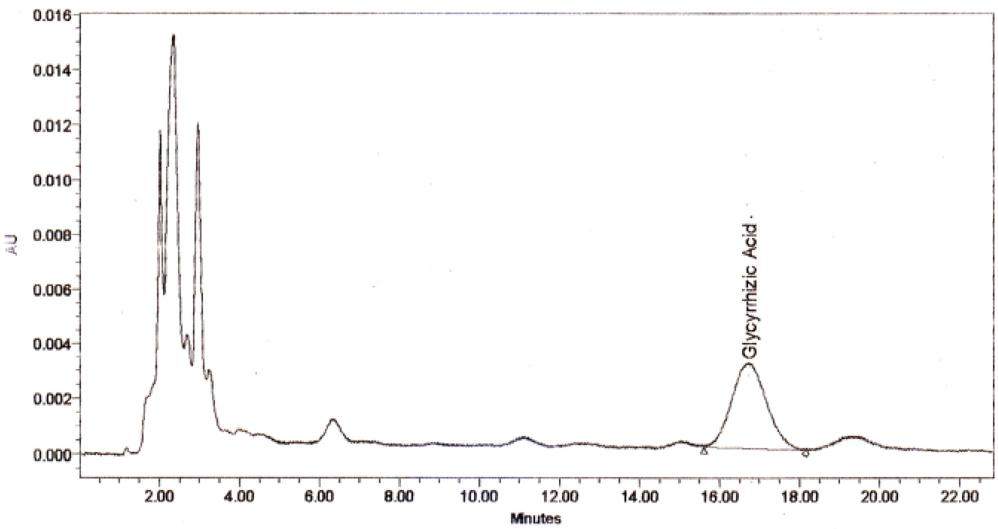
مطابق با British Pharmacopia حداقل مقدار استاندارد اسید گلیسیریزیک در شیرین بیان برابر با 4٪ است (Ahmadi Hosseini et al., 2014). Usai و همکاران (1995) مقدار اسید گلیسیریزیک را در ریشه شیرین بیان نمونه‌های ایتالیایی بین 2/24 -1/96 درصد گزارش کردند. Hennell و همکاران (2008) مقدار اسید گلیسیریزیک را در ریشه‌های شیرین بیان در مناطق جغرافیایی، شرایط آب و هوایی، گونه‌ها و فصل برداشت مختلف بین 2 تا 15 درصد وزنی گزارش کردند. Mareshige و همکاران (2011) مقدار گلیسیریزین 100 نمونه شیرین بیان را در محدوده زمانی 5 سال بررسی کردند. مقدار گلیسیریزین این گیاهان 0/46 تا 4/67 درصد گزارش گردید. Charpe و Rathod (2012) استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان را با روش التراسونیک بررسی کردند. حداکثر بازدهی اسید گلیسیریزیک برابر با 36/4 mg/g به‌دست آمد.

مقایسه استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان در حمام التراسونیک و پراب التراسونیک

میزان استخراج اسید گلیسیریزیک توسط پراب التراسونیک و حمام التراسونیک مشابه بوده و برابر با 5/5 درصد وزنی بود. این عدد از متوسط مقادیر اسید گلیسیریزیک استخراج شده در آزمایش‌های قبلی بیشتر است (شکل 10). می‌توان نتیجه گرفت که در استخراج توسط التراسونیک تفاوتی بین حمام و پراب نمی‌باشد. از طرفی توزیع اندازه ذرات تاثیر مثبتی بر استخراج دارد.



(a)(الف)



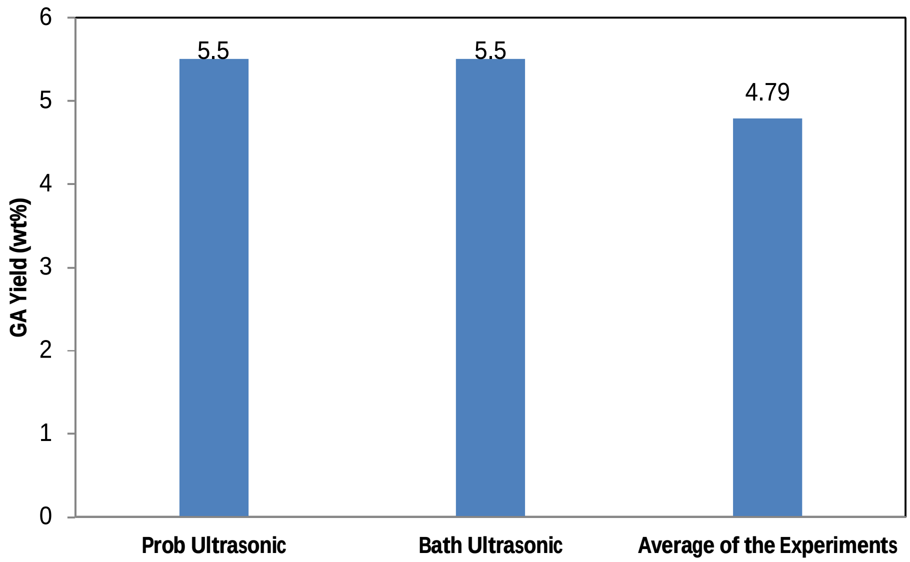
(b)(ب)

شکل 9- کروماتوگراف RP-HPLC برای (الف) نمونه استاندارد (ب) یک نمونه عصاره در این پژوهش

Fig. 9. RP-HPLC chromatograph for (a) standard sample (b) an extract sample in this study

نتایج نشان داد که در روش‌های متداول استخراج، توزیع اندازه ذره نفوذپذیری ذرات جامد را تحت تاثیر قرار می‌دهد. ذرات یکنواخت‌تر تخلخل منظم ایجاد می‌کند. در این حالت جریان یکنواخت حلال از میان ذرات جامد امکان استخراج یکسان را برای همه ذرات فراهم می‌کند. یک توزیع گسترده اندازه ذرات شامل ذرات با اندازه‌های مختلف و ذرات ریز و درشت است. در این حالت ذرات ریز درون منافذ خالی میان ذرات درشت‌تر را پر کرده و یک بستر جامد متراکم را تشکیل می‌دهد که حجم تهی و در نتیجه نفوذپذیری آن کمتر است. در این صورت، کانال‌هایی در بستر جامد برای عبور حلال تشکیل شده و استخراج ناهمگن صورت می‌گیرد (Ming, 2007). در حالی که در سیستم التراسونیک مکانیسم استخراج متفاوت است. مکانیسم اصلی استخراج با التراسونیک، پدیده کاویتاسیون است. در پدیده کاویتاسیون در حلال حباب‌های ریزی تشکیل شده و تا اندازه بحرانی رشد می‌کنند. پس از آن انفجار صورت گرفته و منجر به آزادسازی مقدار زیادی انرژی می‌گردد. این انرژی به حلال منتقل می‌شود و منجر به ایجاد اغتشاشات شدیدی به‌صورت موضعی در حلال

می‌گردد. اغتشاشات ایجاد شده باعث افزایش انتقال جرم می‌شود (Keyhani et al., 2016). با به‌کار بردن امواج التراسونیک جهت استخراج مواد موثره از گیاهان دارویی، سرعت استخراج و بازده آن افزایش می‌یابد. بنابراین توزیع اندازه ذره منجر به استخراج بیشتر مواد موثره از گیاهان می‌گردد. چنانکه در شکل 10 نیز مشاهده می‌شود توزیع اندازه ذرات تاثیر مثبتی بر استخراج دارد و منجر به افزایش استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان می‌شود.



شکل 10- مقایسه استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان در حمام التراسونیک (با توزیع اندازه ذرات شیرین بیان) و پراب التراسونیک (با توزیع اندازه ذرات شیرین بیان)

Fig. 10. The comparison of glycyrrhizic acid extraction from licorice root using ultrasonic bath (with licorice particle size distribution) and ultrasonic probe (with licorice particle size distribution)

نتیجه‌گیری

استخراج با التراسونیک یک روش مطمئن برای استخراج مواد موثره از گیاهان است. مزایای اصلی این روش شامل کاهش زمان استخراج و درجه حرارت مورد نیاز و افزایش راندمان استخراج است. کاهش درجه حرارت منجر به اجتناب از آسیب حرارتی گیاه در طی فرایند استخراج می‌شود. در این پژوهش بررسی آماری استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان با استفاده از التراسونیک انجام گرفت. پارامترهای مورد بررسی شامل اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان بود. طراحی آزمایش‌ها و مدلسازی پاسخ‌ها به‌ترتیب با استفاده از روش فاکتوریل کامل و روش سطح پاسخ صورت گرفت. متغیرهای وابسته شامل عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک بود. نتایج نشان داد که با کاهش قطر ریشه شیرین بیان، میزان استخراج افزایش یافت. در بهترین شرایط تجربی، 5/5 درصد وزنی استخراج اسید گلیسیریزیک صورت گرفت. همچنین راندمان به‌دست آمده با روش استخراج در حمام التراسونیک با پراب التراسونیک نتایج یکسانی را نشان داد. مقدار R^2 برای پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک به‌ترتیب برابر با 0/8803 و 0/9088 به‌دست آمد که بیانگر مناسب بودن مدل‌های پیشنهاد شده و برازش مدل بر اساس روش سطح پاسخ است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مسئولین محترم سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران بواسطه حمایت مالی این پژوهش تشکر می‌گردد.

منابع

1. Ahmadi Hosseini, S. M., Souri, M.K., Farhadi, N., Moghaddam, M., Omidbaigi, R. (2014). Changes in *glycyrrhizin* content of Iranian *licorice* (*Glycyrrhiza glabra L.*) affected by different root diameter and ecological conditions. *Agrcultural Communications*, 2(4), 27-33.
2. Ahmadian, H., Mirahmadi, F., Rashidzadeh, B., (2018). Effects of ultrasound on extraction of *glycyrrhizin* from *Glycyrrhiza glabra L.* in comparison with modified Rosen's method. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 33(6), 961-974. (In Persian). DOI: 10.22092/IJMAPR.2018.108293.1885
3. Bolouri Moghaddam, E., Hemmati, Kh., Bashirisadr, Z., and Mashayekhi, K. (2009). Effect of harvest time and root diameter on *Glycyrrhizin* content in *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of Plant Production*, 16(2), 29-45. (in Persian)
4. British Pharmacopoeia, (2009). Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, London.
5. Charpe, T.W., Rathod, V.K. (2012). Extraction of *glycyrrhizic acid* from *licorice* root using ultrasound: Process intensification studies. *Chemical Engineering and Processing,* 54, 37– 41. https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.002
6. Charpe, T.W., Rathod, V.K. (2014). Effect of ethanol concentration in ultrasound assisted extraction of *glycyrrhizic acid* from *licorice* root, *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 11(4), 21-30.
7. Douglas, J.A., Douglas, M. H., Lauren, D. R., Martin, R. J., Deo, B., Follett, J. M., Jensen, D. J. (2004). Effect of plant density and depth of harvest on the production and quality of *licorice* (*Glycyrrhiza glabra*) root harvested over 3 years, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science,* 32, 363-373. https://doi.org/10.1080/01140671.2004.9514317
8. Hemati, Kh., Hemati, N., Ghaedi, A., (2015). The effect of habtat, root diameter, and type of tissue on some secondary metabolites content of *licorice* (*glycerrhiza glabra*) in Khorasan Razavi (Ghoochan), *Journal of Plant Evvironmental Physiology*, 10(3) 1-10. (In Persian).
9. Hennell, J. R., Lee, S., Khoo, C. S., Gray, M. J., Bensoussan, A. (2008). The determination of *glycyrrhizic acid* in Glycyrrhiza uralensis Fisch. ExDC. (Zhi Gan Cao) root and the dried aqueous extract by LC– DAD, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 47, 494-500. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.01.037
10. Keyhani, V., Mortazavi, S.A., Karimi, M., Karazhiyan, H., Sheikholeslami, Z., (2016). Ultrasound-assisted extraction of saponins from *chubak* plant (*Acanthophyllum Glandulosum*) root based on their emulsification and foaming properties, *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 4(4), 325-342. (in Persian). DOI:10.22101/JRIFST.2016.01.30.444
11. Khanahmadi, M., Gaffarzadegan, R., Khalighi-Sigaroodi, F., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., Hajiaghaee, R. (2018). Optimization of the *glycyrrhizic acid* extraction from *licorice* by response surface methodology, *Iranian Journal of Chemistry and Chemal Enineering*, 37 (1), 121-129 .
12. Liao, J., Qu, B., Zheng, N., (2016). Extraction of *glycyrrhizic acid* from *glycyrrhiza uralensis* using ultrasound and Its process extraction model, *Applied Sciences*, https://doi.org/10.3390/app6110319
13. Mareshige, K., Hayashi, S., Shibata, T., Yamamoto, Y., Sekizaki, H. (2011). Variation of *glycyrrhizin* and *liquiritin* contents within a population of 5-year-old *licorice* (Glycyrrhiza uralensis) plants cultivated under the same conditions, *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 34, 1334-1337. https://doi.org/10.1248/bpb.34.1334
14. Ming, O. S. (2007). Comparative study on optimization of continuous countercurrent extraction for *licorice* roots. (MSc thesis), Department of Pharmacy. National University of Singapore, Singapore.
15. Mukhopadhyay, M., Panja, P., (2008). A novel process for extraction of natural sweetener from *licorice* (*Glycyrrhiza glabra*) roots. *Separation and Purification Technology,* 63, 539–545. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.06.013
16. Noori, W. O., Waisi, B.I, Alhassani, M.H. (2018). Extraction of *glycyrrhizin* from *licorice* (*Glycyrrhiza Glabra L.*) by bulk liquid membrane. *Environmental Technology & Innovation* 12, 180–188. https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.08.010
17. Pan, X., Liu, H., Jia, G., and Shu, Y. Y. (2000). Microwave-assisted extraction of *glycyrrhizic acid* from *licorice* root. *Biochemical Engineering Journal*, 5, 173–177. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00057-7
18. Shabkhiz, M.A., Eikani, M.H., Golmohammad, F., Bashiri Sadr, Z., (2015). Optimized Pressurized hot water extraction of *glycyrrhizic acid* from *Licorice* roots, *Innovative Food Technologies*, 2(4), 11-21. (In Persian). DOI:10.22104/JIFT.2015.200
19. Usai, M., Vincenzo, P., Domenico, A. (1995). *Glycyrrhizin* variability in subterranean organs of Sardinian Glycyrrhiza glabra subspecies glabra var. glabra. *Journal of Natural Products*, 58, 1727-1729. https://doi.org/10.1021/np50125a013
20. Yeop, A., Sandanasamy, J., Pang, S. F., Abdullah, S., Yusoff, M.M., Gimbun, J. (2017).The effect of particle size and solvent type on the *gallic acid* yield obtained from Labisia pumila by ultrasonic extraction, *MATEC Web of Conferences 111, 02008 (2017) FluidsChE 2017*, https://doi.org/10.1051/matecconf/201711102008.